



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# T-cellsinfiltrat och cytokinprofil vid atopisk dermatit hos hund

*Frida Mårtensson*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014:25

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **T-cellsinfiltrat och cytokinprofil vid atopisk dermatit hos hund**

T cell infiltrate and cytokine profile in canine atopic dermatitis

*Frida Mårtensson*

**Handledare:**

Magnus Åbrink, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap  
Caroline Fossum, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:**

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Omslagsbild:** Eva Mårtensson

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014:25  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Atopisk dermatit, hund, T-celler, cytokinprofil, Th1, Th2, TARC, IL-31.

**Key words:** Canine atopic dermatitis, T cells, cytokine profile, Th1, Th2, TARC, IL-31.



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturöversikt.....	4
T-cellssvar .....	4
Cytokinprofil .....	5
Non-Lesional skin (NLS) .....	6
Lesional skin (LS) .....	7
Mononukleära celler från perifert blod (PBMC).....	8
Lesioners uppkomst.....	8
Interleukin-31 .....	9
Diskussion .....	10
Referenser.....	13



## **SAMMANFATTNING**

Atopisk dermatit hos hund (CAD) är en kliande hudsjukdom med komplex patogenes som involverar felreglering av immunförsvaret, allergisk sensibilisering, defekter i hudbarriären, mikrobiell kolonisation samt olika miljöfaktorer. Dock är den inbördes relationen mellan dessa faktorer inte klargjord. En ökad förståelse för sjukdomens patogenes, bland annat den immunologiska bakgrunden inklusive vilken T-cells- och cytokinprofil som kännetecknar sjukdomen, skulle kunna öka drabbade hundars livskvalitet genom förbättrade behandlingsmetoder. Studier har undersökt cellinfiltrat och visat att både CD4<sup>+</sup> och CD8<sup>+</sup> T-celler förekommer i ökade mängder i huden hos AD-hundar, och således att det finns Th-celler samt CTLs och/eller suppressoriska T-celler i denna hud. Dessa studier hittade också förhöjda CD4/CD8-kvoter, vilket visar på en ökad lymfocytreaktivitet. Andra studier har tittat på förekomsten av olika cytokiner, både hos hundar med naturligt förekommande sjukdom samt hos hundar i en modell för CAD där lesioner inducerats. Undersökta cytokiner inkluderar för Th2-svar IL-4, IL-5, IL-6 och IL-13, för Th1-svar IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  och IL-12 (p35 och p40) samt för immunosuppressivt eller T-regulatoriskt svar TGF- $\beta$  och IL-10. Även transkriptionsfaktorer har undersökts, samt chemokinen TARC. Resultaten för de specifika cytokinerna och transkriptionsfaktorerna skiljer sig till viss del från varandra, men den sammantagna bilden blir att CAD kännetecknas av ett förhöjt Th2-svar i hud utan lesioner och att detta Th2-svar kombineras med ett Th1-svar i hud med lesioner. Th2-svaret tenderar att vara ännu starkare i lesionerna än i hud utan lesioner. TARC framstår som en viktig chemokin då den hittats hos AD-hundar men inte hos andra hundar, och då den induceras av Th1-cytokiner men rekryterar Th2-celler utgör den också en koppling mellan dessa två svar och kan förklara tendensen till starkare Th2-svar i lesioner. Resultaten är mindre enhetliga för immunosuppressiva eller T-regulatoriska cytokiner och här, liksom på vissa övriga punkter, skulle mer forskning behövas. Slutligen framstår även den nyligen identifierade cytokinen IL-31 som viktig för CAD, då den dels inducerar klåda och dels hittats hos hundar med CAD men inte hos hundar med annan klåda. Det har visats att denna cytokin produceras av T-celler, och den passar väl in i den ovan beskrivna bilden av CAD, då IL-31 induceras av en Th2-polarisering men uttryck av dess receptor kräver ett Th1-svar.

## SUMMARY

Canine atopic dermatitis is a complex pruritic skin disease and the pathogenesis includes immune dysregulation as well as allergic sensitization, skin barrier defects, microbial colonisation and various environmental factors, but the relationship between these factors remains unclear. An increased understanding of the pathogenesis, including the T cell and cytokine profile as part of the immune dysregulation, could increase the quality of life of affected dogs by improving treatments. Studies have shown that levels of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are increased in the skin of dogs with CAD, both in lesional and non-lesional skin; that is, the skin of dogs with CAD contains both T helper cells and cytotoxic and/or suppressive T-cells. There were also increased CD4/CD8 ratios, indicating higher lymphocyte reactivity. Other studies have investigated the presence of various cytokines, both in dogs with naturally occurring CAD and in dogs in a model for CAD where lesions were induced. The investigated cytokines include: For a Th2 response IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13; for a Th1 response IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  and IL-12 (p35 and p40); and for an immunosuppressive or T-regulatory response TGF- $\beta$  and IL-10. Certain transcription factors have also been investigated, as well as the chemokine TARC. Results vary somewhat regarding specific cytokines and transcription factors, but overall, a picture emerges of CAD as a disease characterized by an increased Th2 response in non-lesional skin which in lesional skin is combined with an additional Th1 response. The Th2 response in lesional skin has a tendency to be even stronger than the one in non-lesional skin. TARC, having been found in dogs with AD but not in other dogs, emerges as an important chemokine, and as TARC is induced by Th1 cytokines but recruits Th2 cells, it also provides an explanation for the tendency toward a stronger Th2 response in lesions. Results are less consistent regarding immunosuppressive or T-regulatory cytokines, and for these as well as certain other aspects further research could elucidate the matter. Lastly, the newly identified cytokine IL-31 also appears important in CAD, as it induces pruritus and has been found in dogs with CAD but not in other dogs. It has been shown that this cytokine is produced by T cells, and IL-31 thus fits the above described picture of CAD, especially as it is induced by a Th2 polarization but expression of its receptor requires a Th1 response.



## INLEDNING

Atopisk dermatit hos hund (canine atopic dermatitis, CAD) definieras som ”en genetiskt predisponerad inflammatorisk och kliande allergisk hudsjukdom med karakteristiska kliniska kännetecken associerade med Immunoglobulin E (IgE)-antikroppar som oftast är riktade mot miljöallergen” (Halliwell 2006). Ibland talas också om canine atopic-like dermatitis eller intrinsic CAD, vilket är en klinisk identisk sjukdom där man ej lyckats identifiera IgE-antikroppar mot miljöallergen eller andra allergen (Marsella et al. 2012). De vanligaste miljöallergen mot vilka IgE-antikroppar riktas kommer från kvalstersläktet *Dermatophagoides* (House dust mite, HDM) (Nuttall et al. 2013). CAD är en multifaktoriell sjukdom och felreglering av immunförsvaret, allergisk sensibilisering, defekter i hudbarriären, mikrobiell kolonisation och miljöfaktorer är alla involverade (Nuttall et al. 2013). Det är dock oklart hur dessa faktorer interagerar med varandra, och vilka som är primära respektive sekundära (Marsella et al. 2012; Nuttall et al. 2013).

Sjukdomen yttrar sig vanligen tidigt, hos djur under tre år, och det första symptomet är ofta klåda utan synliga lesioner, varefter de områden som oftast får lesioner är tassar, axillae (området motsvarande armhålan), buk samt öron. Sekundära bakterie- eller jästinfektioner är vanliga, liksom otiter (Favrot et al. 2010). Kliniska symptom och anamnes är viktiga faktorer för att ställa diagnos, men det finns bl.a. stora rasvariationer och inga av de kriterier som tagits fram är patognomona, varför det är viktigt att utesluta andra orsaker, såsom ektoparasiter och fodermedelsallergi, innan diagnos ställs (Nuttall et al. 2013).

Eftersom CAD dels har visats påverka drabbade hundars livskvalitet negativt (Linek et al. 2010) och dels är en vanlig sjukdom som drabbar upp till 10 % av alla hundar i världen (Nuttall et al. 2013) skulle många hundars livskvalitet förbättras om sjukdomen kunde botas eller behandlas mer effektivt. För att utveckla nya, effektiva behandlingsmetoder är det dock viktigt att förstå sjukdomens bakgrund och patogenes. Detta är ett område med intensiv forskning, och denna litteraturstudie sammanfattar därför delar av de framsteg som gjorts när det gäller immunförsvaret och CAD. På grund av ämnets omfattning och arbetets ramar har syftet specificerats till att klargöra vilket T-cellsinfiltrat och vilken cytokinprofil som kännetecknar atopisk dermatit hos hund.

## MATERIAL OCH METODER

Litteratursökning har gjorts i databaserna Web of Science samt PubMed med söktermerna "Canine atopic dermatitis" OR ("atopic dermatitis" AND (dog OR dogs OR canine)) OR "atopic dogs" kompletterade med en eller flera av följande: Review, immunology, "immunological background", development, IL-31. I PubMed har funktionen att specificera bland sökresultaten använts, med specifikationerna "Other animals" samt "Veterinary Medicine" och "Immunology". Till stor del har sedan referenser från valda artiklar använts, samt funktionen Recommended articles i Elsevier Science.

## LITTERATURÖVERSIKT

### T-cellssvar

Cellinfiltratet i både dermis och epidermis har jämförts mellan hud från friska kontrollhundar (control skin, CS) och hud från hundar med atopisk dermatit (AD-hundar), från både områden med lesioner (lesional skin, LS) och från till synes frisk hud (non-lesional skin, NLS) hos samma hundar (Olivry et al. 1997; Sinke et al. 1997). I tabell 1 respektive 2 sammanställs resultaten från dessa studier för NLS respektive LS.

Olivry et al. (1997) undersökte cellinfiltratet med avseende på samtliga celler, och fann bland annat att i både dermis och epidermis tenderade antalet T-celler att vara högre i både LS och NLS jämfört med CS, och högst i LS. I dermis var det statistiskt signifikanta skillnader. I denna studie var även CD4/CD8-kvoten signifikant högre i LS än i CS. Dessutom tenderade CD4/CD8-kvoten för NLS att vara högre än CS men lägre än LS.

Sinke et al. (1997) undersökte enbart T-cellspopulationen, och fann i LS ett högre antal av CD4+ och CD8+ T-celler i både dermis och epidermis, med en förhöjd CD4/CD8-kvot i epidermis. Även i NLS var cellantalet signifikant högre för både CD4+ och CD8+ i epidermis, men endast CD8+ var signifikant högre i dermis. Eftersom CD8+ celler inte bara kan vara cytotoxiska utan också ha en reglerande verkan på CD4+ celler diskuterar författarna att detta skulle kunna vara förklaringen till att just CD8+ celler var förhöjda i NLS dermis, då dessa skulle kunna balansera nivåerna av CD4+ celler. Av denna studie kan man också avläsa att nivåerna av T-celler i LS tenderade att vara högre än de i NLS, även om detta inte var signifikant.

*Tabell 1. T-cellsinfiltrat i hud utan lesioner (non-lesional skin) från hundar med CAD jämfört med hud från friska hundar (control skin)*

	Non-Lesional Skin, NLS					
	Epidermis			Dermis		
	CD4+	CD8+	CD4/CD8-kvot	CD4+	CD8+	CD4/CD8-kvot
Olivry et al. 1997		↑	-	↑*		↑
Sinke et al. 1997	↑*	↑*	↔	↑	↑*	↔

*Teckenförklaring: ↑ innebär högre nivåer; ↔ innebär inga signifikanta skillnader; \* markerar signifikanta skillnader och - markerar att studien inte undersökt den aktuella faktorn. För Olivry et al. (1997) redovisas T-cellsnivån sammantaget, inte CD4+ och CD8+ separat.*

Tabell 2. T-cellsinfiltrat i hud med lesioner (lesional skin) från hundar med CAD jämfört med hud från friska hundar (control skin)

	Lesional Skin, LS					
	Epidermis			Dermis		
	CD4+	CD8+	CD4/CD8-kvot	CD4+	CD8+	CD4/CD8-kvot
Olivry <i>et al.</i> 1997		↑	-	↑*		↑*
Sinke <i>et al.</i> 1997	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↔

Teckenförklaring: ↑ innebär högre nivåer, ↔ innebär inga signifikanta skillnader, \* markerar signifikanta skillnader och - markerar att studien inte undersökt den aktuella faktorn. För Olivry *et al.* (1997) redovisas T-cellsnivån sammantaget, inte CD4+ och CD8+ separat.

För att skilja olika subpopulationer av de CD4+ T-hjälparcellerna åt krävs att man tittar på cytokinmiljön snarare än celler och deras ytmolekyler.

## Cytokinprofil

Ett flertal studier har jämfört cytokinförekomsten i form av mRNA-uttryck mellan hud från friska kontrollhundar (CS) och hud från hundar med AD, där hud med och utan lesioner (LS och NLS) provtagits från samma hundar (Maeda *et al.* 2002; Nuttall *et al.* 2002; Schlotter *et al.* 2011). En annan studie har istället jämfört mRNA-uttrycket i mononukleära celler i perifert blod (PBMC), (Hayashiya *et al.* 2002). Cytokinerna delas upp i grupper utifrån vilken typ av T-hjälparsvär de associeras med, och på så vis klassas Interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-6 och IL-13 som Th2-cytokiner medan IL-1β, Interferon-γ (IFN-γ), IL-2, Tumour necrosis factor-α (TNF-α) och IL-12 (p35 och p40) klassas som Th1-cytokiner. Transforming growth factor-β (TGF-β) samt IL-10 klassas istället som immunosuppressiva (Hayashiya *et al.* 2002; Maeda *et al.* 2002; Nuttall *et al.* 2002; Schlotter *et al.* 2011), även om IL-10 i en studie klassas som en Th2-cytokin (Hayashiya *et al.* 2002). Utöver dessa cytokiner har en studie också studerat thymus- and activation-regulated chemokine (TARC), även kallad CCL17 (Maeda *et al.* 2002), vars uttryck enligt en human studie korrelerar till sjukdomsaktivitet (Kakinuma *et al.* 2001). TARC aktiverar och rekryterar selektivt Th2-celler via CCR4, en TARC-receptor som uttrycks på Th2-celler (Imai *et al.* 1999), samtidigt som en studie gjord på murina keratinocyter visade att produktion av TARC induceras av Th1-cytokinerna IL-1β, IFN-γ och TNF-α (Vestergaard *et al.* 1999). En nyare studie gjord på keratinocyter från hund visade att TNF-α, men inte IL-1β eller IFN-γ, gav ökad produktion av TARC (Shibata *et al.* 2010). Just keratinocyter har visats vara en viktig källa till TARC i huden hos hundar med CAD (Maeda *et al.* 2005).

Ovanstående studier har alltså studerat hundar med naturligt förekommande sjukdom, varför åldern på de specifika lesionerna var okänd. Det gör att studierna ger begränsad information, eftersom utvecklingen av lesionerna är en dynamisk process (Marsella *et al.* 2006a). För att studera lesionernas patogenes krävs istället en modell där man kan inducera lesioner

(Marsella et al. 2006a), och andra studier har på detta vis studerat lesioners uppkomst (Marsella et al. 2006a; Maeda et al. 2007).

En nyare studie har också jämfört förekomsten av den nyligen identifierade cytokinen Interleukin-31 (IL-31) i serum hos hundar med och utan AD (Gonzales et al. 2013). Denna studie tittade också på effekterna av att administrera IL-31 till hundar, och en annan studie (McCandless et al. 2014) undersökte produktion av IL-31 och uttryck av dess receptor.

### **Non-Lesional skin (NLS)**

Nuttall et al. (2002) hittade signifikant högre nivåer av Th2-cytokinen IL-4 i NLS jämfört med CS, och även IL-6 tenderade att vara högre i NLS, men det var inte en signifikant skillnad. Däremot skiljde sig nivåerna av Th1-cytokinerna IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , och IL-12 (p35 och p40) inte från nivåerna i CS. Slutligen hittade författarna lägre halter TGF- $\beta$  i NLS jämfört med CS, medan IL-10 uppvisade stora variationer mellan individer men inga signifikanta skillnader.

En annan studie hittade, i kontrast till ovanstående, inga skillnader i IL-4-nivåer eller i TGF- $\beta$ -nivåer mellan NLS och CS, men däremot signifikant högre nivåer av IL-13 samt IL-10 i NLS. Även transkriptionsfaktorer till cytokinerna undersöktes: STAT6, SOCS3 och GATA3 för Th2-cytokiner; STAT4, SOCS5 och T-bet för Th1-cytokiner; och Fox-P3 för immunosuppressiva cytokiner. SOCS3 fanns i signifikant högre nivåer i NLS jämfört med CS, men inga signifikanta skillnader hittades för de övriga Th2-relaterade transkriptionsfaktorerna och varken Th1-relaterade eller immunosuppressiva transkriptionsfaktorer uppvisade några signifikanta skillnader när man jämförde NLS och CS (Schlotter et al. 2011).

En tredje studie (Maeda et al. 2002) hittade inga signifikanta skillnader mellan NLS och CS för Th1-cytokinerna IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  och TNF- $\alpha$ , i överensstämmelse med ovanstående studier. I tabell 3 ses en sammanställning över de olika studiernas fynd för NLS.

*Tabell 3. Cytokiner i hud utan lesioner (non-lesional skin, NLS) från hundar med CAD jämfört med hud från friska hundar (control skin)*

	Non-Lesional Skin, NLS											
	Th2				Th1						Immunosuppressive	
	IL-4	IL-5	IL-6	IL-13	IL-1β	IFN-γ	IL-2	TNF-α	IL-12p40	IL-12p35	TGF-β	IL-10
Nuttall <i>et al.</i> 2002	↑*	-	↑	-	-	↔	↔	↔	↔	↔	↓*	↔
Schlotter <i>et al.</i> 2011	↔	-	-	↑*	-	↔	-	-	↔	↔	↔	↑*
Maeda <i>et al.</i> 2002	-	-	-	-	↔	↔	-	↔	-	-	-	-

*Teckenförklaring: ↑ innebär högre nivåer; ↓ innebär lägre nivåer; ↔ innebär inga skillnader; \* markerar signifikanta skillnader och - innebär att studien inte undersökte den cytokinen.*

### Lesional skin (LS)

Nuttall et al. (2002) visade att nivåerna av Th2-cytokinerna IL-4 respektive IL-6 precis som i NLS var signifikant högre respektive tenderade att vara högre i LS jämfört med CS; nivåerna i NLS och LS var likartade. Även för de immunosuppressiva cytokinerna var resultaten likartade: TGF- $\beta$  var signifikant lägre även i LS jämfört med CS, och IL-10 uppvisade inga signifikanta skillnader. Däremot förekom Th1-cytokiner i högre nivåer i LS; IFN- $\gamma$ , IL-2 och TNF- $\alpha$  uppvisade alla signifikant högre nivåer i LS jämfört med både NLS och CS. IL-12 däremot uppvisade stora variationer och inga signifikanta skillnader mellan grupperna.

Schlotter et al. (2011) hittade precis som i NLS inga skillnader i IL-4-nivåer eller i TGF- $\beta$ -nivåer mellan LS och CS, men signifikant högre nivåer av IL-13 samt IL-10. Intressant är också att nivåerna av IL-13 och IL-10 i denna studie är signifikant högre inte bara jämfört med CS utan även jämfört med NLS. Dessutom påvisades signifikant högre nivåer av IFN- $\gamma$  i LS jämfört med NLS, precis som i studien av Nuttall et al (2002). Även Th1-transkriptionsfaktorn STAT4 var signifikant högre i LS jämfört med både NLS och CS, medan de andra Th1-transkriptionsfaktorerna, SOCS5 och T-bet, inte uppvisade signifikanta skillnader mellan LS och CS. SOCS5 var dock signifikant högre i LS jämfört med NLS. Denna studie fann slutligen också signifikant lägre nivåer av IL-12p40 i LS jämfört med NLS.

Även Maeda et al. (2002) hittade förhöjda nivåer av Th1-cytokiner i LS jämfört med både NLS och CS – IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  och TNF- $\alpha$  var alla signifikant högre i LS. TARC hittades i samtliga LS-prover men inte i några NLS-prover, och författarna konstaterar att de höga halterna IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  och TNF- $\alpha$  tillsammans med TARC-förekomst stämmer överens med de tidigare resultaten (Vestergaard et al. 1999) från studien gjord på murina keratinocyter, där dessa cytokiner stimulerade produktion av TARC. De olika studiernas resultat för LS finns sammanställda i Tabell 4.

Tabell 4. Cytokiner i hud med lesioner (lesional skin, LS) från hundar med CAD jämfört med hud från friska hundar (control skin)

	Lesional Skin, LS											
	Th2				Th1						Immunosuppressive	
	IL-4	IL-5	IL-6	IL-13	IL-1β	IFN-γ	IL-2	TNF-α	IL-12p40	IL-12p35	TGF-β	IL-10
Nuttall <i>et al.</i> 2002	↑*	-	↑	-	-	↑*	↑*	↑*	↔	↔	↓*	↔
Schlotter <i>et al.</i> 2011	↔	-	-	↑*	-	↑*	-	-	↔	↔	↔	↑*
Maeda <i>et al.</i> 2002	-	-	-	-	↑*	↑*	-	↑*	-	-	-	-

Teckenförklaring: ↑ innebär högre nivåer; ↓ innebär lägre nivåer; ↔ innebär inga skillnader; \* markerar signifikanta skillnader och - innebär att studien inte undersökte den cytokinen.

### Mononukleära celler från perifert blod (PBMC)

I studien gjord på PBMC tenderade halterna av IL-4 vara högre hos AD-hundar jämfört med kontrollhundar, men detta var inte en signifikant skillnad. Denna studie hittade dock signifikant högre nivåer av IL-5 hos AD-hundar, men precis som Nuttall *et al* (2002) inga signifikanta skillnader för IL-10. IFN- $\gamma$  fanns i signifikant lägre nivåer hos AD-hundar än hos friska hundar (Hayashiya *et al.* 2002). Resultaten från denna studie finns sammanställda i Tabell 5.

Tabell 5. Cytokiner i mononukleära celler från perifert blod.

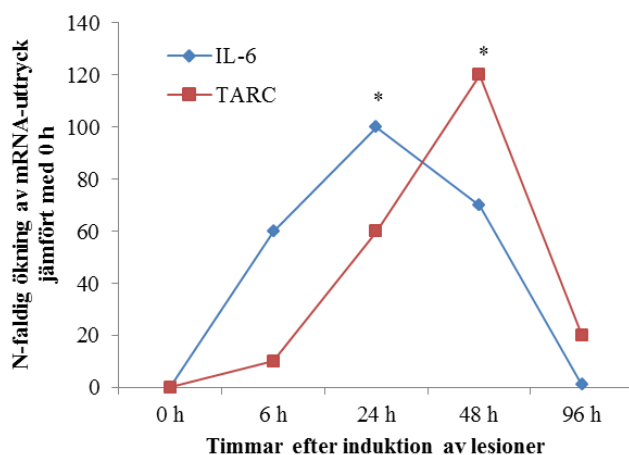
	Mononukleära celler från perifert blod, PBMC											
	Th2				Th1						Immunosuppressiva	
	IL-4	IL-5	IL-6	IL-13	IL-1β	IFN-γ	IL-2	TNF-α	IL-12p40	IL-12p35	TGF-β	IL-10
Hayashiya et al. 2002	↑	↑*	-	-	-	↓*	-	-	-	-	-	↔

Teckenförklaring: ↑ innebär högre nivåer; ↓ innebär lägre nivåer; ↔ innebär inga skillnader; \* markerar signifikanta skillnader och - innebär att studien inte undersökte den cytokinen.

### Lesioners uppkomst

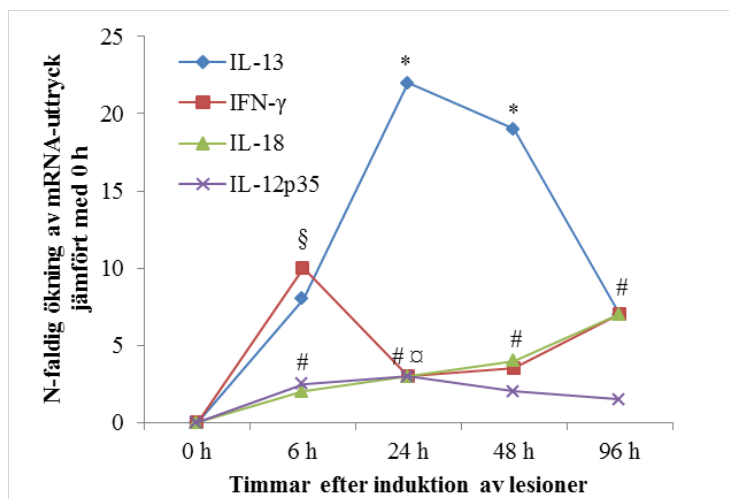
En modell som tagits fram för CAD består av beaglar med höga halter IgE som sensibiliserats med HDM-allergen. Vid provokation med HDM-allergen utvecklar dessa hundar lesioner som är kliniskt, histopatologiskt och immunologiskt (bl.a. i form av cellinfiltrat med både CD4+ och CD8+ T-celler) lika lesioner som utvecklas hos hundar med naturlig AD vid samma provokation (Marsella *et al.* 2006b).

I en studie gjord på denna modell undersöktes hur cytokinprofilen på mRNA-nivå i hudbiopsier förändrades under de första 96 timmarna efter inducering av lesioner, jämfört med en grundnivå i biopsier tagna utan att man inducerat lesioner. De undersökta cytokinerna



Figur 1. Proinflammatoriska cytokiner och chemokiner, värden efter induktion av lesioner. \* markerar signifikans. Figuren baseras på värden uppskattade från figurer i Marsella *et al.* 2006a.

klassades enligt följande: Både IL-6 och TNF- $\alpha$  som proinflammatoriska, TARC och IL-8 som chemokiner, IL-4, IL-5, IL-10 och IL-13 som Th2-cytokiner och IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 och IL-18 som Th1-cytokiner. Induktionen av lesioner resulterade i att IL-6 uppvisade en topp vid 24 h och var då signifikant högre än grundnivån. Därefter uppvisade TARC signifikant högre nivåer än grundnivån vid sin topp vid 48 h. Man såg även att TARC:s receptor, CCR4, uttrycktes hos majoriteten av hundarna efter 48 och 96 h,



Figur 2. Th2- och Th1-cytokiner, värden efter induktion av lesioner. Signifikans markeras av \* för IL-13, § för IFN- $\gamma$ , # för IL-18 och  $\square$  för IL-12p35. Figuren baseras på värden uppskattade från figurer i Marsella et al. 2006a.

oväntad topp vid 6 h (statistiskt signifikant), som sedan följdes av ett lägre värde vid 24 h som stigit vid 48 och 96 h. Författarna diskuterar om den tidiga toppen kan bero på förekomsten av cellinfiltrat redan innan lesioner inducerades, medan den senare stegringen kan vara kopplad till IL-18, som var signifikant högre från 6 h och framåt med nivåer som ökade med tiden. IL-12p35 uppvisade en signifikant topp vid 24 h och sjönk sedan, medan inga signifikanta skillnader uppmättes för IL-12p40 eller IL-2. De signifikanta skillnader som uppmättes för Th2- och Th1-cytokiner presenteras i figur 2. Författarna diskuterar en modell där keratinocyter och Langerhans celler producerar IL-6 samt TARC efter allergenprovokation, vilket driver en T-cellsaktivering, specifikt Th2-rekrytering. Även IL-13, som också kan produceras av Langerhans celler, skulle kunna vara involverad här. Detta skulle kunna följas av en IL-12-styrd switch till Th1, även den styrd av Langerhans celler. (Marsella et al. 2006a).

En annan studie tog blodprov av hundar från samma modell som utsatts för allergener i miljön och analyserade för Th2-cytokiner (IL-4 och IL-13) och immunosuppressiva cytokiner (TGF- $\beta$  och IL-10) på dag 0, 2, 4 och 17. Denna studie hittade inga signifikanta skillnader på nivåerna av IL-4 och IL-13, men signifikant lägre nivåer av TGF- $\beta$  på dag 4 och av IL-10 på dag 4 och 17. (Maeda et al. 2007).

### Interleukin-31

En studie visade att hundar som administrerats med IL-31 uppvisade beteenden relaterade till klåda inom 4h, och att symptomen vanligen upphörde inom 24 h. Författarna såg inga andra symptom. Studien undersökte sedan förekomsten av IL-31 i serum hos hundar med AD och hundar utan AD, specifikt hundar som sensibiliserats med HDM-allergen, hundar med konstaterad loppallergi och som under försöket provocerades med loppor och hundar utan allergisk sjukdom. IL-31 påvisades i 57 % av hundarna med AD, men inte hos några av de andra grupperna. Således kunde inte IL-31 påvisas ens hos de loppallergiska hundarna, trots att de uppvisade klådrelaterade beteenden, och författarna diskuterar att detta skulle kunna

dock med varierande styrka. Däremot uppmättes inga signifikanta skillnader för den andra proinflammatoriska cytokinen TNF- $\alpha$  eller för den andra chemokinen IL-8. De signifikanta skillnader som uppmättes för proinflammatoriska cytokiner och chemokiner presenteras i Figur 1. Th2-cytokinen IL-13 var signifikant högre vid 24 och 48 h, medan data ej var tillräcklig för att kunna statistiskt jämföra IL-4-nivåerna. Inga signifikanta skillnader hittades för IL-5 eller IL-10. För Th1-cytokinen IFN- $\gamma$  sågs en

bero på att IL-31 inte är involverat i klåda som kommer från loppallergi, att de hundarna hade cirkulerande IL-31 men under detektionsnivån eller att de bara varit utsatta för loppor under 1 vecka innan proverna togs. Vidare diskuterar författarna att de återstående 43 % av AD-hundarna, som inte hade påvisbara nivåer av IL-31, skulle kunna ha cirkulerande nivåer av IL-31 under detektionsnivån eller att IL-31 skulle kunna verka lokalt men inte finnas systemiskt, och att vidare forskning med tanke på det senare bör undersöka huden hos AD-hundar snarare än som i detta fall serum. Ett annat alternativ är att IL-31 inte var involverat i dessa hundars patogenes, då AD är en multifaktoriell sjukdom med komplexa interaktioner och det därför inte vore förvånande om olika hundar uppvisade olika förändringar (Gonzales et al. 2013).

En annan studie tillsatte immunostimulerande substanser till PBMC och fann att tillsats av ett ämne som visats stimulera T-celler gav IL-31 produktion, medan övriga substanser inte gav det, vilket tyder på att T-celler är en källa till IL-31. I studien stimulerades sedan sensibiliserade (Th2-polariserade) samt icke-sensibiliserade PBMC med HDM-allergen, bakterietoxin samt en kombination av de två. Alla tre alternativ gav upphov till IL-31-produktion i sensibiliserade PBMC, och kombinationen av allergen och bakterietoxin gav mest produktion. Icke sensibiliserade celler producerade signifikant mindre IL-31 - då gav endast kombinationen av allergen och toxin resultat över detektionsnivån - och författarna konstaterar därför att Th-cellers polarisering med ett cytokinsvar verkar vara en viktig faktor i IL-31-produktion. Slutligen visade studien också att uttrycket av IL-31:s receptor IL-31R $\alpha$  i monocyter ökade 10-faldigt vid behandling med Th1-cytokinen IFN- $\gamma$ , vilket författarna valde att undersöka då de såg att de sensibiliserade PBMC ovan producerade IFN- $\gamma$  vid upprepade provokationer. Även nivåerna av IL-31R $\alpha$  i keratinocyter ökade, från att inte ha varit detekterbara utan IFN- $\gamma$ -behandling till att vara detekterbara med stimulering, men nivåerna var fortfarande i storleksordningen 1000 gånger lägre än nivåerna i de obehandlade monocytorna (McCandless et al. 2014).

## DISKUSSION

Studierna som undersökt cellinfiltrat i huden hos AD-hundar (Olivry et al. 1997, Sinke et al. 1997) visar att T-cellsnivåerna i huden generellt var förhöjda i både LS och NLS hos hundar med AD, även om de exakta resultaten varierar något mellan epidermis och dermis. Vidare visar de att nivåerna tenderade att vara ännu högre i LS än i NLS, även om detta inte var signifikant i någon av studierna. Således finns T-hjälparceller (Th-celler) samt cytotoxiska T-celler (CTLs) och/eller suppressoriska T-celler i huden på AD-hundar. Man skulle kunna tänka sig att dessa resultat motsvarar överreaktiv hud i NLS och att lesioner uppstår när denna hud sedan reagerar på något, vilket visar sig som ett ännu större T-cellsinfiltrat i LS. Detta är också förenligt med de förhöjda CD4/CD8-kvoterna, eftersom en förhöjd CD4/CD8-kvot visar på högre andel T-hjälparceller och därmed en ökad lymfocyteaktivitet.

När det gäller studierna gjorda på cytokiner i huden hos friska hundar jämfört med AD-hundar skiljer sig resultaten till viss del från varandra. Det finns flera tänkbara orsaker till detta. Till att börja med har studierna i regel använt ett litet antal hundar. Flera studier har 10 eller färre hundar per grupp (Hayashiya et al. 2002; Maeda et al. 2002; Marsella et al. 2006a; Maeda et



al. 2007), och de studier som använt fler AD-hundar (26 respektive 28) har fortfarande haft ett lågt antal kontrollhundar (12 respektive 7) (Nuttall et al. 2002 respektive Schlotter et al. 2011). Ingen av dessa studier har heller räknat på vilken styrka (power) detta faktiskt ger. Fortsättningsvis har studierna delvis tittat på olika cytokiner och ingen studie ger därför en komplett bild, och man har undersökt uttryck av mRNA istället för uttryck av aktiva cytokiner. Uttryck av mRNA behöver inte till fullo motsvara uttryck av aktiva cytokiner, eftersom reglering av cytokinuttrycket kan ske efter mRNA-transkriptionen, och flera av författarna påpekar också att man behöver konfirmera förekomst av aktiva cytokiner (t.ex. Nuttall et al. 2002 och Marsella et al. 2012). Nivåerna av transkriptionsfaktorer är ett ännu mer indirekt mått och slutsatser baserade på dessa nivåer är därför ännu mer osäkra. Ytterligare en osäkerhetsfaktor är att de studier som använde naturligt förekommande sjukdom inte kände till lesionernas ålder. Detta innebär att det är möjligt att en del av skillnaderna helt enkelt beror på att studierna har undersökt lesioner av olika åldrar och att cytokinprofilen skiljer sig åt beroende på lesionernas ålder. En faktor som går in i detta är hur länge innan studiens början man avbrutit behandling med antiinflammatoriska medel, vilket i 3 av studierna varierar från 2 till 6 veckor (Hayashiya et al. 2002; Nuttall et al. 2002; Schlotter et al. 2011) medan en fjärde studie inte specificerar detta (Maeda et al. 2002). Man kan tänka sig att flera veckor borde ha gett lesioner nog tid att nå ett kroniskt och därmed likartat stadium, men samtidigt kan nya lesioner ständigt utvecklas under dessa veckor, så detta går ej att säga med säkerhet. Trots dessa osäkerheter och olikheter kan man dock se vissa tydliga trender i resultaten i de olika studierna.

När det gäller Th2-cytokiner har en studie hittat signifikant förhöjda halter av IL-4 hos AD-hundar (Nuttall et al. 2002), och en annan kunde se detta som en trend (Hayashiya et al. 2002), medan en tredje studie tvärtom inte hittade några signifikanta skillnader på IL-4-nivåerna men däremot högre halter av IL-13 (Schlotter et al. 2011), en cytokin som de två andra studierna inte undersökte. På liknande sätt hittade en studie förhöjda halter IL-5 hos AD-hundar (Hayashiya et al. 2002), men ingen av de andra studierna undersökte denna cytokin. Dock har samtliga studier hittat förhöjda halter av någon eller några av de Th2-relaterade cytokiner hos hundar med AD, i både NLS och LS, vilket tyder på att ett förhöjt Th2-svar är karakteristiskt för CAD. Även resultatet att Th2- transkriptionsfaktorn SOCS3 var förhöjd i både NLS och LS (Schlotter et al. 2011) passar in i denna bild. Intressant är också att SOCS3 och även IL-13 i denna studie var signifikant förhöjda i LS inte bara jämfört med CS utan även jämfört med NLS (Schlotter et al. 2011), vilket tyder på att Th2-svaret förstärks ytterligare i lesioner.

De Th1-relaterade cytokinerna var inte förhöjda i NLS i någon av de aktuella studierna, medan samtliga undersökta Th1-cytokiner förutom IL-12 var högre i LS i alla studier (Hayashiya et al. 2002; Maeda et al. 2002; Nuttall et al. 2002; Schlotter et al. 2011). Även Th1-transkriptionsfaktorn STAT4 var signifikant högre i LS jämfört med både NLS och CS. Detta ger sammantaget en stark bild av att det hos AD-hundar förhöjda Th2-svaret som diskuterats ovan byggs på med ett samtidigt Th1-svar i lesioner, även om de övriga Th1-relaterade transkriptionsfaktorerna inte var förhöjda. Även fynden av chemokinen TARC i samtliga undersökta prover från LS men inte i några från NLS eller CS passar in i denna bild då uttryck av TARC induceras av Th1-cytokiner, och ger också en förklaring till ytterligare

förhöjda Th2-halter i LS eftersom den kopplas till rekrytering av Th2-celler. Nivåerna av IL-12 följer dock inte mönstret som de andra Th1-cytokinerna visar. IL-12 har två subenheter, p40 och p35, som tillsammans bildar den aktiva cytokinen (Trinchieri 2003). De två subenheterernas gener sitter på olika kromosomer och regleras delvis olika (Watford et al. 2004), och medan p35 uttrycks i många celler uttrycks p40 endast i celler som producerar den aktiva cytokinen (Schlotter et al. 2011). Detta gör att det inte är helt lätt att analysera uttrycket av aktivt IL-12 utifrån mRNA-uttryck av dessa subenheter, men att p40 eventuellt ger det bästa måttet (Schlotter et al. 2011). Fyndet i en av studierna (Schlotter et al. 2011) av signifikant lägre IL-12p40 i LS jämfört med NLS skulle kunna vara ett slumpmässigt avvikande resultat, då motsvarande resultat inte hittats i den andra studien som undersökt IL-12 (Nuttall et al. 2002) och det som sagt avviker från det förhöjda Th1-svar som i övrigt iakttagits. Samtidigt är rollen av IL-12 såpass oklar att det är svårt att spekulera i detta överhuvudtaget.

För de immunosuppressiva cytokinerna är resultatet mindre enhetligt. Av de två studier som undersökt TGF- $\beta$  hittade den ena (Nuttall et al. 2002) signifikant lägre nivåer hos AD-hundar medan den andra (Schlotter et al. 2002) inte såg några skillnader. IL-10 uppvisade stora variationer mellan individer, utan signifikanta skillnader mellan grupper, i två studier (Nuttall et al. 2002, Hayashiya et al. 2002), medan en tredje studie (Schlotter et al. 2011) hittade signifikant högre nivåer i både NLS och LS jämfört med CS, och också signifikant högre i LS än i NLS. Den regulatoriska transkriptionsfaktor som undersöktes, Fox-p3, uppvisade däremot inte signifikanta skillnader (Schlotter et al. 2011). Således framträder ingen enhetlig bild när det gäller dessa immunosuppressiva eller regulatoriska cytokiner. En möjlig förklaring till detta, utöver att skillnaderna kan bero på variationer i lesionernas åldrar, kan vara att regleringen som ger upphov till den kliniska bilden av CAD ser olika ut hos olika individer.

I studien där lesioner inducerades verkade den proinflammatoriska cytokinen IL-6 inducera lesioner tillsammans med chemokinen TARC, genom att ge ett Th2-svar i form av förhöjda IL-13-nivåer samt uttryck av TARCs receptor CCR4, vilken indikerar förekomst av Th2-celler. Detta Th2-svar följdes av ett Th1-svar som stegrades under de 96 timmarna (Marsella et al. 2006a). Detta är dock endast en studie och innefattar bara 6 hundar, så resultaten skulle behöva konfirmeras med fler studier. Det är möjligt att de Th1-cytokiner som inte uppvisade förhöjda halter i denna studie stiger först efter mer än 96 timmar, vilket också skulle behöva undersökas i ytterligare studier. Skillnaderna över tid av olika cytokiner i denna studie skulle, som tidigare diskuterats, kunna förklara en del av de variationer i cytokinnivåer som setts i de studier som undersökt naturligt förekommande AD, under förutsättning att lesionernas utveckling är likadan hos djur med naturlig sjukdom. Att den studie som utsatte modellhundarna för miljöallergen inte fann några signifikanta skillnader i nivåerna av Th2-cytokinerna IL-4 och IL-13 i blod innan och efter provokation (Maeda et al. 2007) är förenligt med modellen av ett Th2-svar följt av ett Th1-svar om man tar i åtanke att nivåerna av Th2-cytokiner är förhöjda från början hos AD-hundar, och att en ytterligare förhöjning i huden inte nödvändigtvis måste ge utslag i blodet. Intressant är också att nivåerna av de immunosuppressiva cytokinerna TGF- $\beta$  och IL-10 var signifikant lägre först dag 4, och att TGF- $\beta$  sedan stigit till de normala igen vid dag 17 (Maeda et al. 2007), då detta delvis skulle

kunna förklara de stora variationerna som setts i nivåerna av dessa cytokiner i studierna på hundar med naturlig CAD.

Sammantaget framträder en bild av CAD som en sjukdom där huden hos drabbade hundar har ett förhöjt Th2-svar, som i lesioner också kombineras med en Th1-reaktion och eventuellt även en ytterligare förhöjning av Th2-svaret. Vilken roll de regulatoriska cytokinerna har är fortsatt oklar, och det finns även oklarheter i de specifika rollerna och regleringen kring de olika övriga cytokinerna, speciellt de Th2-relaterade samt IL-12. Att CAD uppvisar ett förlopp med tidigt Th2-svar som sedan övergår till ett Th1-svar har också diskuterats av flera författare, bl.a. Nuttall et al. (2013) och Marsella et al. (2012).

Angående IL-31, så tyder förekomsten av cytokinen hos AD-hundar men inte hos några av de andra grupperna på att denna cytokin är viktig i CAD, och möjligen unik för CAD i kontrast till andra kliande hudsjukdomar hos hund (Gonzales et al. 2013). En human studie påvisade IL-31 i hud från patienter med atopisk dermatit men inte i hud från patienter med andra hudsjukdomar, vilket stödjer denna möjlighet (Nobbe et al. 2012). IL-31 kunde dock inte påvisas hos alla AD-hundar (Gonzales et al. 2013), och forskning på området skulle kunna klargöra om det senare beror på att IL-31 inte alltid är involverat i CAD eller på andra orsaker relaterade till studien. Vidare tycks IL-31 tillverkas av T-celler, och intressant är också att denna tillverkning stimuleras av en Th2-polarisering samtidigt som uttrycket av receptorn är beroende av ett Th1-svar i form av IFN- $\gamma$  (McCandless et al. 2014). Det verkar alltså som att det krävs ett blandat Th1/Th2-svar för att IL-31 ska kunna ge effekt i kroppen, och det är intressant nog också just ett sådant blandat svar som verkar känneteckna lesioner i CAD, som diskuterats ovan. Detta är också förenligt med fyndet att IL-31 inducerar klåda (Gonzales et al. 2013), eftersom klåda är något som karakteriserar CAD.

## REFERENSER

- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W. & Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, vol. 21, ss. 23-31.
- Gonzales, A.J., Humphrey, W.R., Messamore, J.E., Fleck, T.J., Fici, G.J., Shelly, J.A., Teel, J.F., Bammert, G.F., Dunham, S.A., Fuller, T.E. & McCall, R.B. (2013). Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, vol. 24, ss. 48-53.
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 114, ss. 207-208.
- Hayashiya, S., Tani, K., Morimoto, M., Hayashi, T., Hayasaki, M., Nomura, T., Une, S., Nakaichi, M. & Taura, Y. (2002). Expression of T helper 1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, vol. 49, ss. 27-31.
- Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P.W., Matsushima, K. & Yoshie, O. (1999). Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *International Immunology*, vol. 11, nr. 1, ss. 81-88.
- Kakinuma, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., Mitsui, H., Tada, Y., Saeki, H., Torii, H., Asahina, A., Onai, N., Matsushima, K. & Tamaki, K. (2001). Thymus and activation-regulated chemokine in

- atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *Journal of Clinical Immunology*, vol. 107, ss. 535-541.
- Linek, M. & Favrot, C. (2010). Impact of canine atopic dermatitis on the health-related quality of life of affected dogs and quality of life of their owners. *Veterinary Dermatology*, vol. 21, ss. 456-462.
- Maeda, S., Fujiwara, S., Omori, K., Kawano, K., Kurata, K., Masuda, K., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2002). Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 88, ss. 79-87.
- Maeda, S., Tsuchida, H., & Marsella, R. (2007). Allergen challenge decreases mRNA expression of regulatory cytokines in whole blood of high-IgE beagles. *Veterinary Dermatology*, vol. 18, ss. 422-426.
- Maeda, S., Tsukui, T., Saze, K., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H. & Iwabuchi, S. (2005). Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 103, ss. 83-92.
- Marsella, R., Olivry, T., & Maeda, S. (2006a). Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Veterinary Dermatology*, vol. 17, ss. 111-120.
- Marsella, R., Olivry, T., Nicklin, C. & Lopez, J. (2006b). Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Veterinary Dermatology*, vol. 17, ss. 24-35.
- Marsella, R., Sousa, C.A., Gonzales, A.J. & Fadok, V.A. (2012). Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 241, nr. 2, ss. 194-207.
- McCandless, E.E., Rugg, C.A., Fici, G.J., Messamore, J.E., Aleo, M.M. & Gonzales, A. (2014). Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 157, ss. 42-48.
- Nobbe, S., Dziunycz, P., Mühleisen, B., Bilsborough, J., Dillon, S.R., French, L.E & Hofbauer, G.F.L. (2012). IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, vol. 92, ss. 24-28.
- Nuttall, T., Knight, P.A., McAleese, S.M., Lamb, J.R. & Hill, P.B. (2002). Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 32, ss. 789-795.
- Nuttall, T., Uri, M. & Halliwell, R. (2013). Canine atopic dermatitis – what have we learned? *Veterinary Record*, vol. 172, ss. 201-207.
- Olivry, T., Naydan, D.K. & Moore, P.F. (1997). Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *The American Journal of Dermatopathology*, vol. 19, ss. 477-486.
- Schlotter, Y.M., Rutten, V.P.M.G., Riemers, F.M., Knol, E.F. & Willemse, T. (2011). Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 143, ss. 20-26.
- Shibata, S., Maeda, S., Maeda, S., Chimura, N., Kondo, N. & Fukata, T. (2010). Augmentation of CCL17 and CCL28 gene expression by TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IFN- $\gamma$  in cultured canine keratinocytes. *Research in Veterinary Science*, vol. 88, ss. 422-426.
- Sinke, J.D., Thepen, T., Bihari, I.C., Rutten, V.P.M.G. & Willemse, T. (1997). Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 57, ss. 13-23.

- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, ss. 133-146.
- Vestergaard, C., Yoneyama, H., Murai, M., Nakamura, K., Tamaki, K., Terashima, Y., Imai, T., Yoshie, O., Irimura, T., Mizutani, H. & Matsushima, K. (1999). Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 104, ss. 1097-1105.
- Watford, W.T., Hissong, B.D., Bream, J.H., Kanno, Y., Muul, L. & O'Shea, J.J., (2004). Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunological Reviews*, vol. 202, ss. 139-156.